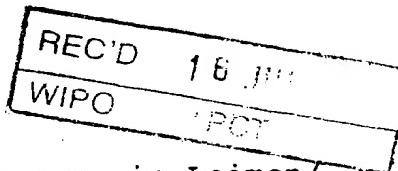


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Bescheinigung



Die Herren Johannes Schumacher in Leimen/
Deutschland und Bernd Welle in Eppelheim/Deutschland
haben eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren und Vorrichtung zur Bestimmung der
Aktivität von Enzymen und Konzentration von
Inhibitoren in Flüssigkeiten"

als Zusatz zur Patentanmeldung 195 27 880.1

am 3. Mai 1996 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue
Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patent-
anmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole
C 12 Q und G 01 N der Internationalen Patentklassifikation
erhalten.

München, den 10. Juli 1996

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Ebert

Aktenzeichen: 196 17 731.6

PRIMARY DOCUMENT

27. April 1996



Verfahren und Vorrichtung zur Bestimmung der Aktivität von Enzymen und Konzentration von Inhibitoren in Flüssigkeiten

Die vorliegende Patent-Anmeldung betrifft die Weiterbildung insbesondere des Verfahrens und der Vorrichtung gemäß der Stammanmeldung P 195 27 880.1.

In der klinisch-chemischen und mikrobiologischen Diagnostik sowie in der biochemischen Forschung hat die Bestimmung von Enzymaktivitäten einen wichtigen Stellenwert. Zur Durchführung solcher Bestimmungen ist bereits eine große Zahl von Verfahren bekannt und zur routinemäßigen Anwendung gelangt.

Dennoch war es bisher unmöglich, die Aktivitäten verschiedener Enzyme schnell und kostengünstig zu messen, da viele von ihnen im Serum, in anderen Körperflüssigkeiten oder in ihren Ursprungszellen zum Schutz ihrer Umgebung teilweise oder vollständig inhibiert vorliegen, d.h. sie sind dort, wo sie Schaden anrichten können, zum überwiegenden Teil inaktiv.

Kommt es nun zu einer pathologischen Veränderung der Umgebung oder der Ursprungszellen selbst, kann sich das Verhältnis zugunsten der nicht inhibierten, aktiven Form ändern, wobei besonders im Serum ein dadurch entstehender Enzymüberschuß möglichst umgehend durch Inhibitoren reversibel blockiert wird.

Daher ist es mit bisher zur Anwendung gelangten Methoden nur bei außergewöhnlich hohen Enzymkonzentrationen möglich, beispielsweise im Serum die freie Aktivität der nicht inhibierten Enzyme zu messen.

Zur frühzeitigen Diagnose von Erkrankungen kann es jedoch notwendig sein, einen Anstieg der absoluten Enzymaktivität pro Volumeneinheit oder das Verhältnis der Volumenaktivitäten der inhibierten zur freien Enzymfraktion möglichst schnell und sicher zu messen, da die mit herkömmlichen Methoden meßbaren Spitzenaktivitäten der freien Enzymfraktion oft erst in fortgeschrittenem Krankheitsverlauf auftreten.

Auch in der Forschung kann die Kenntnis des aktiven Anteils eines Enzyms am Gesamtpool von Bedeutung sein.

Mittels immunologischer Methoden (ELISA) kann zwar die Konzentration auch des inhibierten Anteils einer Enzymklasse bestimmt werden, jedoch ist ein bedeutender Nachteil der immunologischen Methoden die Unmöglichkeit der Unterscheidung zwischen freiem, also aktivem, und inhibiertem Enzym, da ein solches Verfahren die Summe beider Gruppen sowie auch teilweise oder vollständig funktionsuntüchtige Enzyme erfaßt. Eine Messung von Aktivitäten ist ausgeschlossen.

Mittels bekannter Assays zur Messung von Enzymaktivitäten können die beiden Zustandsformen der Enzyme ebenfalls nicht differenziert werden, da hierbei lediglich die freie Form gemessen werden kann.

Wie kann nun zusätzlich zur freien Aktivität eines Enzyms, das in inhibiertem und freiem Zustand vorliegen kann, die Gesamtaktivität gemessen werden?

Die Lösung ist einfach und kostengünstig:

Der Probe, beispielsweise humanem Serum, werden auf chromatographischem Wege spezifische Inhibitoren, die das gewünschte Enzym in seiner Aktivität hemmen, entzogen. Anschließend kann eine normale Aktivitätsmessung durchgeführt werden.

Wird zusätzlich die Aktivität des Enzyms in der unbehandelten Probe gemessen, kann der Anteil des freien bzw. inhibierten Enzyms an der Gesamtfraktion dieses Enzyms in der Probe bestimmt werden.

Das folgende Beispiel soll der Veranschaulichung des Verfahrens dienen:

An ein Sepharose-Gel als Trägersubstanz wird die Cystein-Proteinase Papain gekoppelt. Das so präparierte Gel wird in eine Chromatographiesäule gepackt. Einer in dieser Säule inkubierten Probe, z.B. Gewebehomogenat aus einem Lungentumor, werden alle Inhibitoren entzogen, die eine höhere Affinität zu Papain als zu ihren ursprünglichen Enzymen aufweisen. Diese Enzyme können unter anderem die Cathepsine B, H und L sein, wobei Cathepsin H normalerweise nahezu vollständig inhibiert vorliegt und seine Enzymaktivität erst nach Entzug der Inhibitoren (Stefin A, Kininogen und andere) meßbar wird.

Die Messung der Aktivitäten erfolgt nach den bekannten Assays auf flourometrischem Wege unter Verwendung enzymspezifischer Substrate und Inhibitoren.

Dieses Verfahren, das je nach Verwendungszweck mit den unterschiedlichsten Chromatographiematerialien, Enzymen und Inhibitoren durchführbar ist, kann vollständig automatisiert werden und ist damit für den Routineeinsatz im Labor geeignet (siehe hierzu Abbildung 1).

So kann eine große Anzahl an Proben auf einem Probenrondell oder in einem anderen geeigneten Meßprobenspeicher (3) gelagert werden, wo von jeweils ein definiertes Volumen der zu messenden Probe durch eine Entnahmeverrichtung (2) mittels einer nachgeschalteten Pumpe (7) in eine geeignete Chromatographiesäule (1) geführt wird.

Nach einer vorgeschriebenen Inkubationszeit wird die von den gewünschten Inhibitoren gereinigte Probe durch eine auf die gleiche Weise eingeführte definierte Pufferlösung aus einem Säulenpufferreservoir (4) vollständig aus der Säule gespült und gleichzeitig verdünnt.

Eine anschließende Reinheitsmessung (8), beispielsweise auf photometrischem Wege oder durch Messung der Leitfähigkeit, schließt Probenrückstände in der Säule aus und verhindert gleichzeitig einen unnötig hohen Pufferverbrauch.

Mittels einer weiteren Meßeinrichtung (9) kann das aus der Säule gespülte Gesamtvolumen bestimmt werden.

Um eine homogene Mischung des Probe-Puffergemisches nach dem Ausspülen aus der Säule zu erreichen, ist dieser eine Mischvorrichtung (10) nachgeschaltet.

Mittel einer weiteren Pumpe kann über ein Ventil, das wie alle anderen Funktionseinheiten des Geräts zentral von einem Rechner (18) angesteuert wird, in der vorgeschriebenen Reihenfolge Meßpuffer, Substrat, eventuell Inhibitoren und die in einem bekannten Verhältnis durch die anfangs verwendete Pufferlösung verdünnte Probe in eine flourometrische Meßeinheit (5) geleitet werden.

Der Rechner kann nun aus den Meßdaten auf einfache Weise die in der Originalprobe vorliegende Aktivität des gewünschten Enzyms pro Volumeneinheit oder, bei Kenntnis der Proteinkonzentration in diesem Volumen, die Aktivität pro Masseneinheit errechnen.

Zum Vergleich der solchermaßen gemessenen Enzymaktivität mit der Aktivität in der unbehandelten Probe kann diese unter Umgehung der Chromatographiesäule auch direkt zur Messung gebracht werden.

Nach oder bereits während dem Meßvorgang kann mit der automatisch gesteuerten Spülung der Vorrichtung begonnen werden, um Rückstände der Probe vollständig zu entfernen.

Weitere Erläuterungen zu Abbildung 1 finden sich in der Stamm anmeldung.

Um spezielle Aufgaben mit der beschriebenen Vorrichtung optimal lösen zu können, kann die Anordnung einiger Einheiten, insbesondere der Ventile, von der in Abbildung 1 gezeigten abweichen.

Vorteilhaft ist es, wenn zur Steigerung der Effizienz der Vorrichtung mehrere Säulen parallel oder in Reihe geschaltet sind. Auch mehrere parallele flourometrische Messungen der Aktivitäten unterschiedlicher Enzyme aus derselben Probe tragen zu einer höheren Leistungsstärke der Vorrichtung bei.

Anstatt flourometrischer Messung der Aktivitäten spezifischer Enzyme kann auch, je nach Bedarf und verwendetem Meß-Assay, ein anderes Meßsystem, z.B. ein photometrisches, verwendet werden.

Als Besonderheit können unterschiedlich präparierte, selbstverständlich mehrfach verwendbare Säulen verwendet werden, so beispielsweise mit unterschiedlichen Enzymen oder großtechnisch hergestellten Enzymfragmenten sowie auch mit Inhibitoren bestückte Chromatographie-Materialien.

Dank dieser zahlreichen Möglichkeiten können neben Enzymen auch, je nach Säule, Inhibitoren gereinigt werden.

Wird eine mit Enzymen präparierte Säule verwendet, können die den Proben entzogenen Inhibitoren nach dem Erreichen der Kapazität der Säule durch ein einfaches chemisches Verfahren von den Enzymen getrennt und der weiteren Verwendung zugeführt werden. Auf diese Weise könnten auch bislang unbekannte Inhibitoren angereichert und klassifiziert werden.

Wird dagegen eine mit Inhibitoren präparierte Säule verwendet, können der Probe selektiv Enzyme entzogen und klassifiziert werden, die bei diesem Vorgehen anstelle der oben beschriebenen Enzyme (z.B. Cathepsin H) aus der Säule gepülten Inhibitoren (z.B. Kininogen) werden in spezifischen Assays auf ihre in der jeweiligen Probe vorliegende Konzentration und Inhibitoraktivität hin untersucht.

Die Abbildungen erläutern die Weiterbildung.

Die Effizienz der oben beschriebenen Papainsäule (Sephadex-Gel als chromatographisches Trägermaterial, Papain als daran gekoppeltes Enzym) wird im Zusammenhang mit der Untersuchung der Proteininasen Cathepsin B, H und L durch die folgenden Messungen beispielhaft belegt:

1. Gemessen wurden die Aktivitäten (μ U/mg Protein) der Cathepsine B, H und L in Lungengewebehomogenaten von Tumorpatienten vor und nach einem Entzug der korrespondierenden Inhibitoren durch ein

mit Papain präpariertes Sepharose-Gel. Die Inkubationszeit der Proben in der Säule wurden auf 15 Minuten festgelegt.

Abbildung 2 zeigt, daß die Aktivität sowohl im unbefallenen als auch im tumorbefallenen Lungengewebe nach einem Entzug der Inhibitoren auf den Säulen im Median wesentlich höher als in der unbehandelten Probe liegt.

In dieser Grafik wurde für den Vorher-/Nachher-Vergleich jeweils dasselbe Probenkollektiv verwendet. Der Anstieg der Aktivitäten ist nur durch einen Entzug der Inhibitoren zu erklären und literaturkonform.

2. Abbildung 3 zeigt, daß vor einem Entzug der Inhibitoren auf der Papainsäule die Proteinmenge (mg/ml) im Median wesentlich höher liegt als nach einem Entzug, was nur durch einen tatsächlich stattfindenden Entzug der Inhibitoren zu erklären ist.

3. Als Beispiel für den zeitlichen Verlauf der Inhibitorabgabe an das auf die Säule gebundene Papain wurde ein Probenpaar zufällig ausgewählt und die Aktivitäten nach jeweils unterschiedlich langen Inkubationszeiten auf der Papainsäule bestimmt.

Aus Abbildung 4 ist ersichtlich, daß die Aktivität von Cathepsin B vom Zeitpunkt 0 an rapide steigt, um nach etwa 15 Minuten in ein Plateau überzugehen. Der Zeitpunkt 0 ist identisch mit der Messung vor einem Inhibitorentzug.

Auch Abbildungen 5 und 6 zeigen einen starken Anstieg der Aktivitäten nach kurzer Inkubationszeit. Die in Abbildung 6 genannte Restaktivität aus der Aktivitätssmessung von Cathepsin L ist die Aktivität eines noch nicht näher klassifizierten Enzyms.

4. Abbildung 7 stellt den Verlauf der Abnahme des Proteingehalts der unter 3. beschriebenen Probe dar. Schon nach kurzer Zeit hat die Proteinmenge ihr Minimum erreicht und geht im zeitlichen Verlauf in ein Plateau über; d.h. die Inhibitoren werden dank des Überschusses an Papain in der Säule schnell und sicher gebunden.

5. Aus der in Abbildung 8 gezeigten Überlebenskurve (Kaplan-Meier-Kurve) ist ersichtlich, daß diejenigen Patienten, deren Cathepsin H-Aktivität im Tumorgewebe über einem Schwellenwert von $533\mu\text{EU}/\text{mg}$ liegt, eine wesentlich ungünstigere Prognose bezüglich der Überlebenszeit haben als diejenigen, deren Wert unter diesem Schwellenwert liegt. Die Werte für diese wie auch die oben genannten Abbildungen stammen aus Originalmessungen, die mittels einer Papainsäule durchgeführt wurden.

Aus den oben genannten Ausführungen ist -beispielsweise- zu folgern:

- In vielen Körperflüssigkeiten, z.B. Serum, Urin oder Liquor, wie auch in Gewebehomogenaten, Bakteriensuspensionen und anderen Flüssigkeiten liegen in ihrer Aktivität durch spezifische Inhibitoren blockierte Enzyme vor. Die Aktivität dieser Enzyme konnte bisher nicht oder nur bei einem Vorliegen von Spitzenwerten gemessen werden.
- Immunologische Verfahren wie beispielsweise das relativ teure ELISA-Prinzip können nur Gesamtkonzentrationen, nicht jedoch Aktivitäten von intakten und somit funktionstüchtigen Enzymen bestimmen.

- Durch die Verwendung einer entsprechend präparierten chromatographischen Säule ist es möglich geworden, der Probe spezifische Inhibitoren zu entziehen und somit Gesamt- und Teilaktivitäten eines oder mehrerer Enzyme zu messen.
- Ein Nebeneffekt dieser Methode ist die Reinigung und Anreicherung spezifischer Inhibitoren auf der Säule. Diese können anschließend zu Klassifizierungszwecken von dem chromatographischen Material getrennt werden.
- Ebenso ist es möglich, statt Enzyme oder großtechnisch hergestellte Enzymfragmente Inhibitoren, die inzwischen ebenfalls großtechnisch hergestellt werden können, an das Trägermaterial zu binden und somit unbekannte Enzyme zu klassifizieren sowie die jeweils in der Probe vorhandene Inhibitorkonzentration und Inhibitoraktivität zu bestimmen.
- Dank einer Automatisierung kann die oben beschriebene oder eine den Bedürfnissen entsprechende, modifizierte Vorrichtung im täglichen Routinebetrieb des klinisch-chemischen Labors, in der mikrobiologischen Diagnostik oder auch in der biochemischen Forschung eingesetzt werden.
- Dank der Mehrfachverwendbarkeit der Chromatographiesäulen und ihren niedrigen Herstellungskosten ist es möglich, in kurzer Zeit eine große Anzahl von Proben sehr kostengünstig zu untersuchen.
- Durch die Einführung einer entsprechenden Vorrichtung wird ein bisher mangels geeigneter Technik unarbeitetes Aufgaben- und Forschungsgebiet erschlossen.
- Dank des beschriebenen Verfahren und der Vorrichtung ist es möglich, eine Prognose über den Krankheitsverlauf und die Überlebenszeit der Patienten zu erstellen und die Patienten somit einer ihren speziellen Bedürfnissen angepaßte Therapie zuzuführen. Es wird Aufgabe der Forschung sein, mittels des Verfahrens und der Vorrichtung neue, aussagefähige Tumormarker und Verlaufsparameter herauszuarbeiten.
- Auch für die Bakteriologie und Mikrobiologie kann das Verfahren und die Vorrichtung von Bedeutung sein, da die biochemische Klassifikation von beispielsweise Bakterien von beträchtlicher Bedeutung für die Diagnostik ist.

Da die oben beschriebene Vorrichtung nur in gewissem Umfang transportabel ist und sich zur Durchführung eines preisgünstigen Schnelltests außerhalb des Labors wenig eignet, ist, aufbauend auf dem oben beschriebenen und in Abbildung 1 gezeigten Verfahren, die nachfolgend beschriebene Vorrichtung zur Durchführung eines Schnelltests von Vorteil.

Abbildung 9 erläutert die Weiterbildung.

In einer speziellen Spritze (1), die schematisch in den Zustandsformen A, B und C dargestellt ist, befindet sich im unteren Teil

zwischen zwei Mikrofiltern (3 sowie Bestandteil von 5), ein chromatographisches Material (4), an das analog zum oben beschriebenen Verfahren Enzyme, Inhibitoren oder großtechnisch hergestellte Fragmente gekoppelt sind.

Im Zustand vor dem Gebrauch (A) befindet sich im selben Raum wie das chromatographische Material sowie über diesem, jedoch unterhalb des Spritzenstempels (2) im flüssigkeitsgefüllten Raum (6) eine den Erfordernissen entsprechende Flüssigkeit, beispielsweise eine Spül-pufferlösung.

Um den Reaktionszustand (B) zu erreichen, wird eine Probe, beispielsweise Blut, Serum, Urin, Liquor oder eine andere Flüssigkeit, durch einen mittels des Spritzenstempels (2) hergestellten Unterdruck durch die Spritzenöffnung (5), die mit einem Mikrofilter versehen ist, in den Raum, in dem sich das chromatographische Material befindet, eingezogen. Daran schließt sich eventuell eine definierte Inkubationszeit an. Im Reaktionszustand werden der Probe je nach chromatographischem Material die Inhibitoren, z.B. Kininogene bei Verwendung eines mit Papain bestückten Sepharose-Gels, oder die Enzyme entzogen.

Danach wird die so behandelte Probe mittels Druck auf den Spritzenstempel mitsamt der sich in Zustand A über dem Filter (3) und gleichzeitig unter dem Spritzenstempel (2) befindenden Flüssigkeit aus der Spritze durch die Spritzenöffnung (5) hindurch in ein Reaktionsbehältnis (7) verbracht (C).

In dem Reaktionsbehältnis kann sich ein spezifisches Substrat befinden, das beispielsweise durch solchermaßen von ihren Inhibitoren befreite Enzyme spezifisch gespalten wird und auf diese Weise, ähnlich einem Indikator, die Farbe verändert.

Nach einer definierten Zeit kann, beispielsweise anhand der Farbveränderung im Reaktionsbehältnis, das Ergebnis des Schnelltests abgelesen werden.

Dank dieses Verfahrens ist es möglich, auch ohne ein aufwendiges Laborgerät, welchem die in Abbildung 1 beschriebene Vorrichtung zugrundeliegt, eine entsprechende Diagnostik und Prognostik, wenn auch nicht mit den Möglichkeiten und der Präzision, die ein solches Laborgerät bietet, durchzuführen. Zur Anwendung gelangen könnte ein solcher Schnelltest beispielsweise in der präklinischen wie auch klinischen Notfalldiagnostik sowie in der allgemeinärztlichen Praxis.

Patentansprüche

1. Verfahren, insbesondere nach der deutschen Patentanmeldung P 195 27 880.1, zur Bestimmung der Enzyminhibitoren in Flüssigkeiten, bei dem einer Meßprobe die mit mindestens einem Enzyminhibitor korrespondierenden Enzyme entzogen werden und bei dem die so behandelte Meßprobe mittels eines spezifischen Meß-Assays auf die vorhandene Konzentration und/oder Aktivität der spezifischen Inhibitoren untersucht wird, wobei die Enzyme der Meßprobe auf chromatographischem Wege entzogen werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Meßprobe durch eine Säule (1) mit einem chromatographischen Trägermaterial geleitet wird, wobei das Trägermaterial mit einer die Enzyme bindenden Substanz versetzt ist.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die behandelte Meßprobe mit einem geeigneten Säulenpuffer definiert verdünnt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die behandelte Meßprobe zur Herstellung definierter Versuchsbedingungen mit einem geeigneten Meßpuffer versetzt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Messung der Inhibitorenkonzentration und/oder Inhibitoraktivität notwendigen, zum Meß-Assay gehörenden Substanzen zumindest während der Inkubationszeit temperiert werden.

Abb. 1 (gemäß Stammanmeldung)

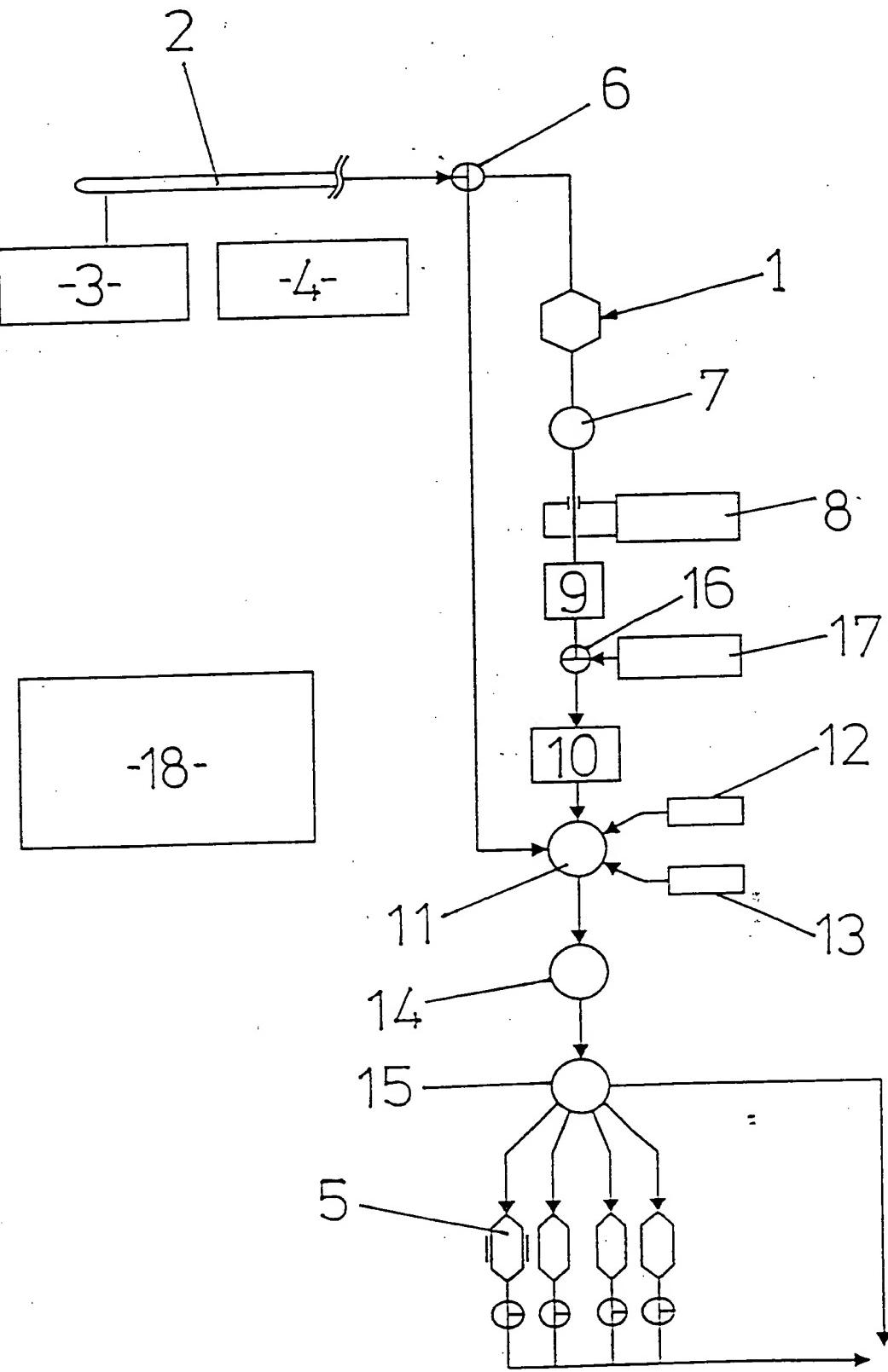
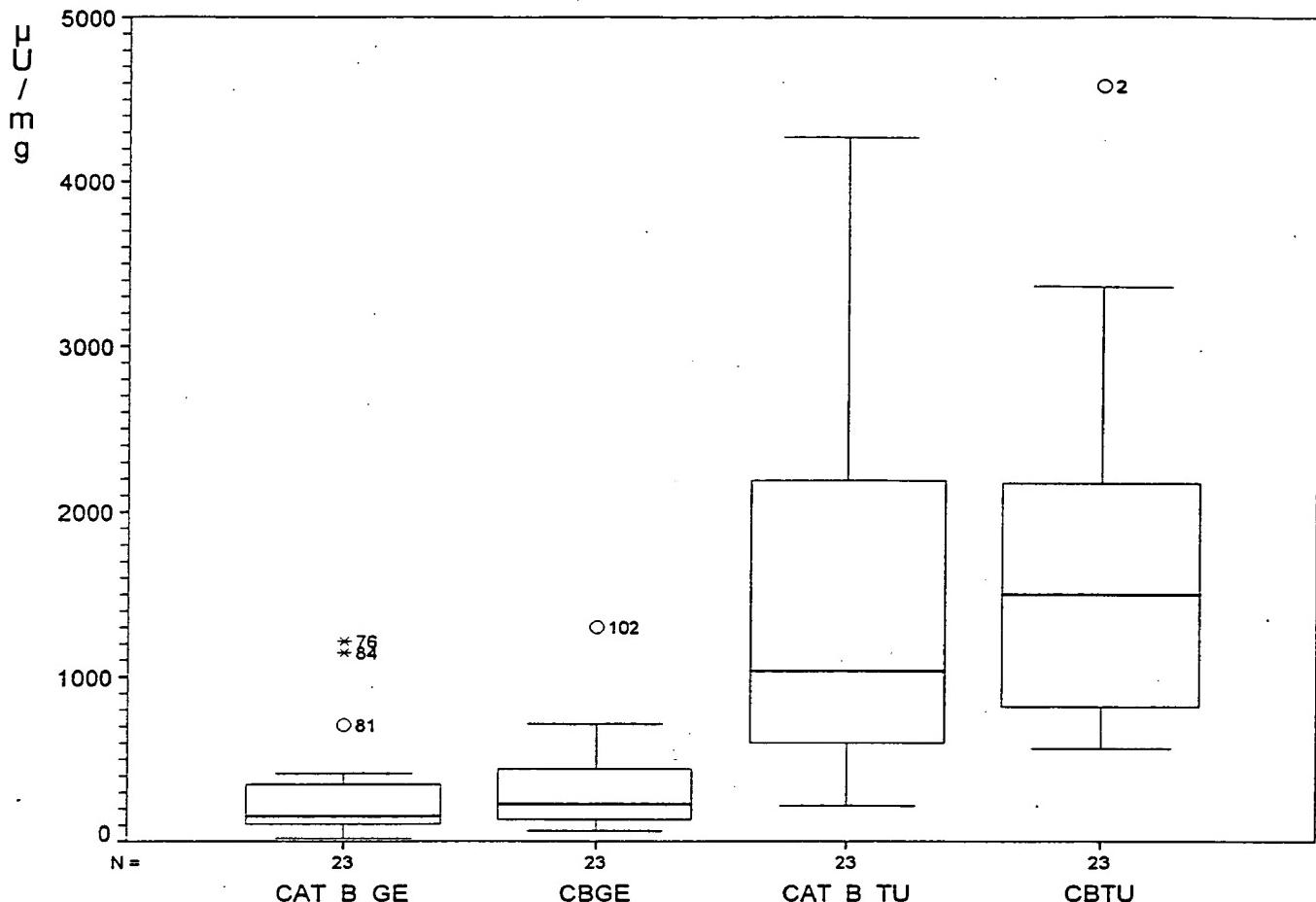


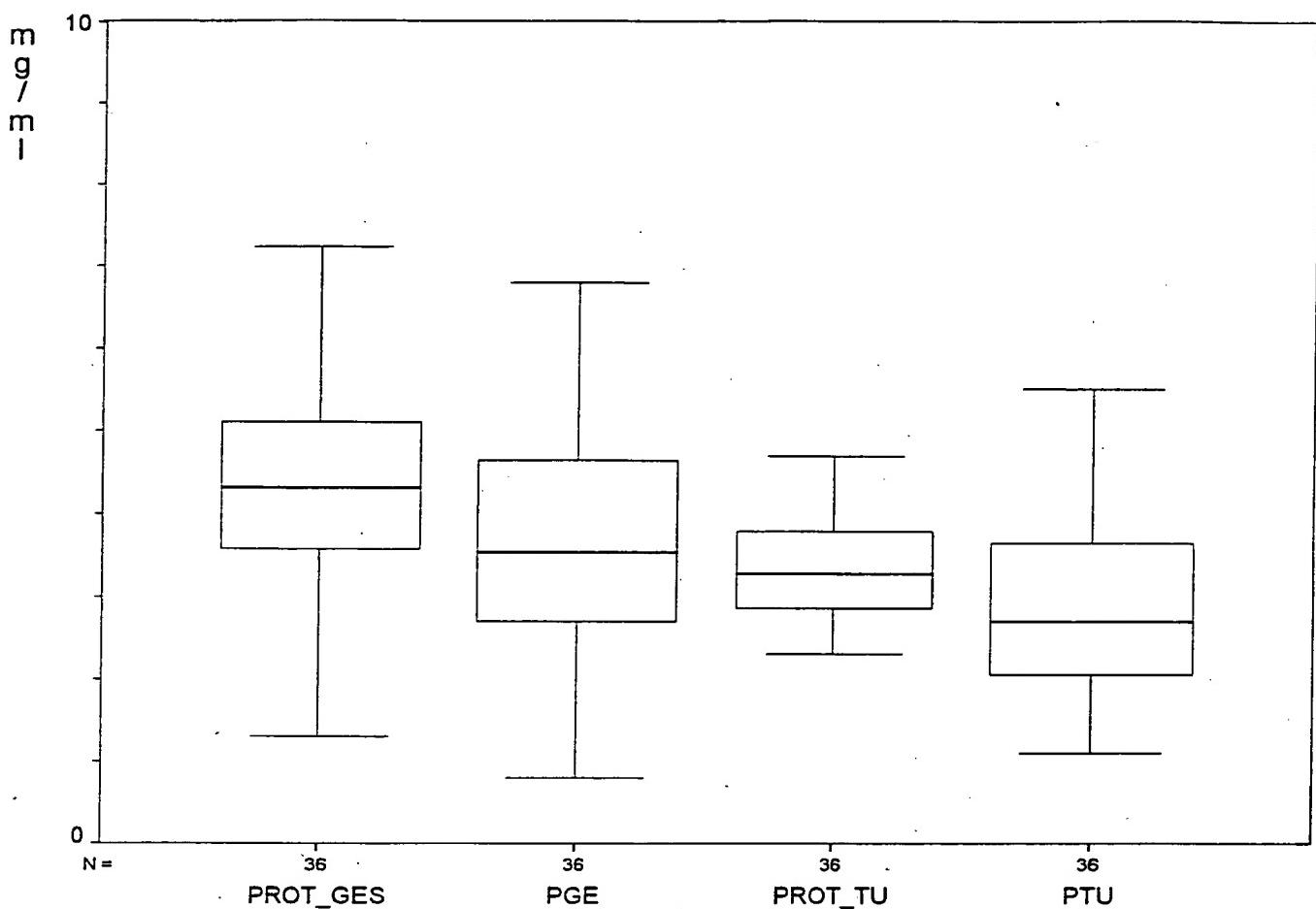
Abb.2: Cathepsin B-Aktivität



LEGENDE:

- CAT_B_GE: Cathepsin B-Aktivität des unbefallenen Lungengewebes vor dem Inhibitorentzug.
- CAT_B_TU: Cathepsin B-Aktivität des tumorbefallenen Lungengewebes vor dem Inhibitorentzug.
- CBGE: Cathepsin B-Aktivität des unbefallenen Lungengewebes nach dem Inhibitorentzug.
- CBTU: Cathepsin B-Aktivität des tumorbefallenen Lungengewebes nach dem Inhibitorentzug.
- N: Fallzahl.
- Y-Achse: Aktivität in $\mu\text{U}/\text{mg}$ Protein.

Abb.3: Proteinmenge



LEGENDE:

PROT_GES: Proteinmenge des unbefallenen Lungengewebes vor dem Inhibitorentzug.

PROT_TU: Proteinmenge des tumorbefallenen Lungengewebes vor dem Inhibitorentzug.

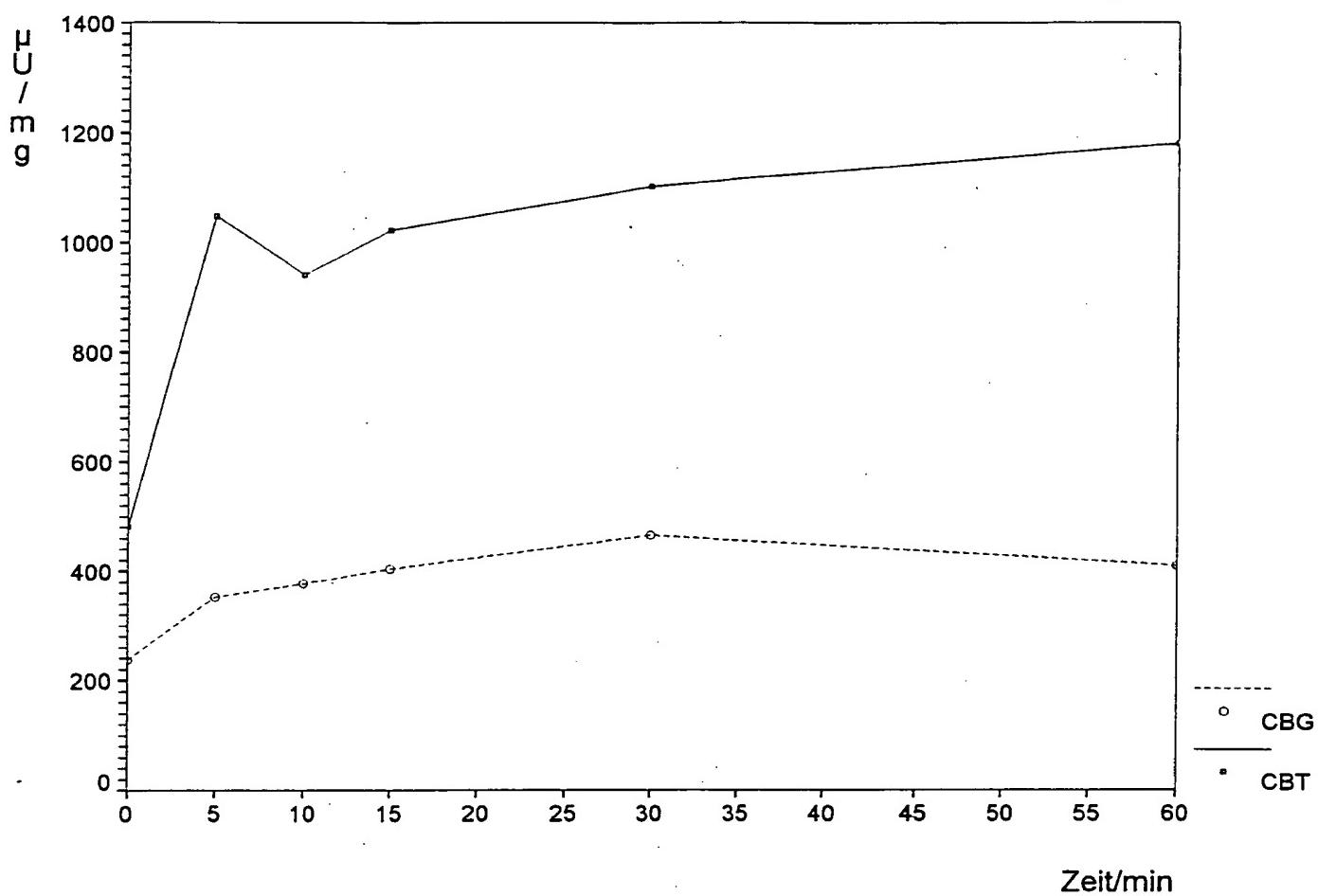
PGE: Proteinmenge des unbefallenen Lungengewebes nach dem Inhibitorentzug.

PTU: Proteinmenge des tumorbefallenen Lungengewebes nach dem Inhibitorentzug.

N: Fallzahl.

Y-Achse: Proteinmenge in mg/ml.

Abb.4: Cathepsin B-Aktivität



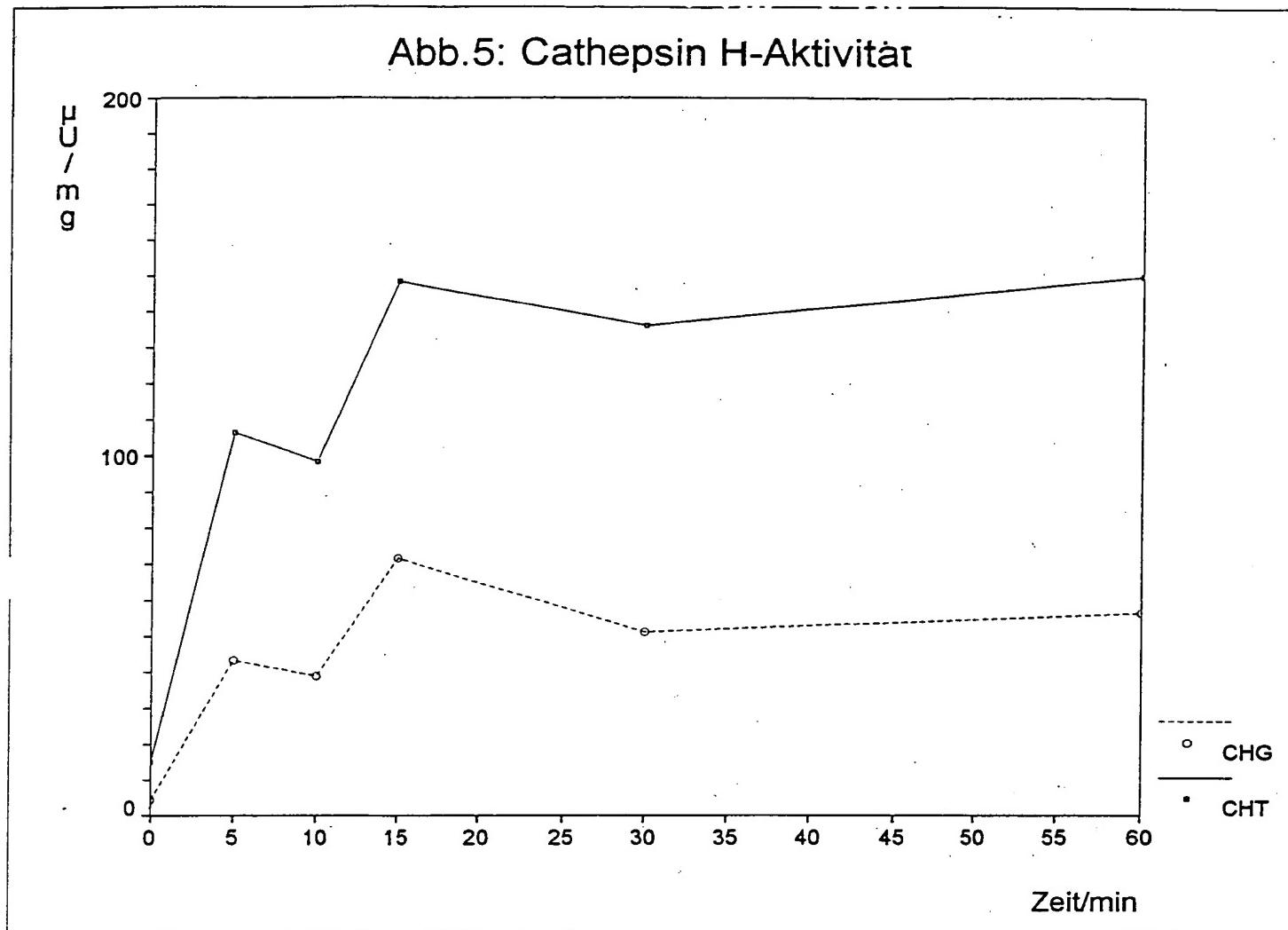
LEGENDE: CBG: Cathepsin B-Aktivität des unbefallenen Lungengewebes vor bzw. nach dem Inhibitorentzug.

CBT: Cathepsin B-Aktivität des tumorbefallenen Lungengewebes vor bzw. nach dem Inhibitorentzug.

X-Achse: Zeitlicher Verlauf in Minuten; 0 min entspricht dem Zustand vor, die weiteren Punkte entsprechen dem Zustand nach einem Inhibitorentzug.

Y-Achse: Aktivität in $\mu\text{U}/\text{mg}$ Protein.

Abb.5: Cathepsin H-Aktivität



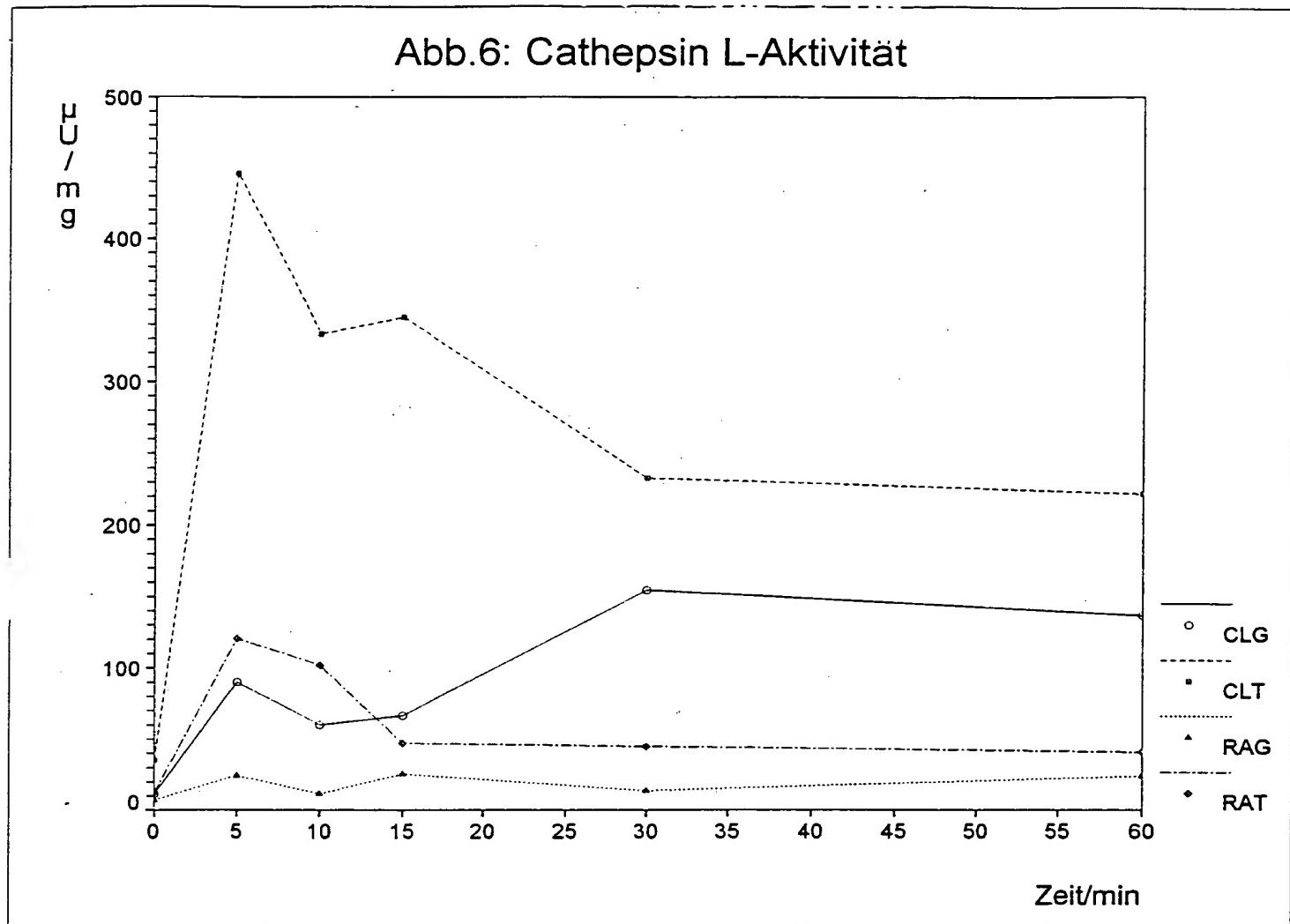
LEGENDE: CHG: Cathepsin H-Aktivität des unbefallenen Lungengewebes vor bzw. nach dem Inhibitorentzug.

CHT: Cathepsin H-Aktivität des tumorbefallenen Lungengewebes vor bzw. nach dem Inhibitorentzug.

X-Achse: Zeitlicher Verlauf in Minuten; 0 min entspricht dem Zustand vor, die weiteren Punkte entsprechen dem Zustand nach einem Inhibitorentzug.

Y-Achse: Aktivität in $\mu\text{U}/\text{mg Protein}$.

Abb.6: Cathepsin L-Aktivität



LEGENDE: CLG: Cathepsin L-Aktivität des unbefallenen Lungengewebes vor bzw. nach dem Inhibitorentzug.

CLT: Cathepsin L-Aktivität des tumorbefallenen Lungengewebes vor bzw. nach dem Inhibitorentzug.

RAG: Restaktivität aus der Messung von CLG nach einer Zugabe von spezifischem Inhibitor für Cystein-Proteinasen (E64).

RAT: Restaktivität aus der Messung von CLT nach einer Zugabe von E64.

X-Achse: Zeitlicher Verlauf in Minuten; 0 min entspricht dem Zustand vor, die weiteren Punkte entsprechen dem Zustand nach einem Inhibitorentzug.

Y-Achse: Aktivität in $\mu\text{U}/\text{mg}$ Protein.